

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 5 年 7 月 2 1 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 7 年特許願第 2 0 7 5 0 8 号

出 願 人

Applicant (s):

雪印乳業株式会社

RECEIVED

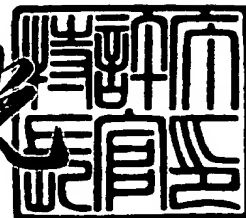
JUL 14 1998

MAKING COPY  
SERVICE CENTER

1 9 9 8 年 4 月 3 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平 1 0 - 3 0 2 5 0 1 6



【書類名】 特許願

【整理番号】 SNMFP95239

【提出日】 平成 7年 7月21日

【あて先】 特許庁長官 清川 佑二 殿

【発明の名称】 新規蛋白質及びその製造方法

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1

【氏名】 後藤 雅昭

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋622 マロニエハイツ201

【氏名】 津田 英資

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑5-22-6

【氏名】 望月 伸一

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ3-1

【氏名】 矢野 和樹

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡河内町下岡本3777-4

【氏名】 小林 文枝

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑4丁目17の5

【氏名】 島 伸行

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県小山市神山1-4-14 レックス小山プレニエ107号

特平 7

【氏名】

保田 尚孝

【発明者】

【住所又は居所】

栃木県下都賀郡石橋町石橋 57

- 4

西浦ハイツ 2

【氏名】

中川 信明

【発明者】

【住所又は居所】

栃木県下都賀郡壬生町幸町 3丁目 11の12

【氏名】

森永 伴法

【発明者】

【住所又は居所】

埼玉県川越市今福 1672-1 メゾンむさし野 719

【氏名】

上田 正次

【発明者】

【住所又は居所】

埼玉県川越市山田 1769-10

【氏名】

東尾 侃二

【特許出願人】

【識別番号】

000006699

【氏名又は名称】

雪印乳業株式会社

【代表者】

片山 純男

【代理人】

【識別番号】

100090941

【弁理士】

【氏名又は名称】

藤野 清也

【電話番号】

3226-6671

【代理人】

【識別番号】

100105061

【弁理士】

【氏名又は名称】

児玉 喜博

【電話番号】

3226-6671

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第 54977号

【出願日】 平成 7年 2月20日

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 014834

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 1

【包括委任状番号】 9406430

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規蛋白質及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60 kD (還元条件下)、約60 kD及び約120 kD (非還元条件下)

(b) 親和性 ; 陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(c) 熱安定性 ; 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

(d) アミノ酸配列 ; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1～3のアミノ酸配列をもつ。

【請求項2】 ヒト線維芽細胞が産生する、請求項1記載の蛋白質。

【請求項3】 ヒト線維芽細胞を細胞培養し、培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、アフィニティークラム及び逆相カラムへの吸着及び溶出を行なって精製することを特徴とする請求項1または2記載の蛋白質の製造方法。

【請求項4】 アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なう請求項3記載の蛋白質の製造方法。

【請求項5】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNA。

【請求項6】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNAとハイブリダイズするDNA。

【請求項7】 配列表 配列番号5の塩基配列で示されるcDNA。

【請求項8】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNAが発現された蛋白質。

【請求項9】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするcDNAが発現され、破骨細胞分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。

【請求項10】 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNAを遺伝子として用いて、次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法。

(a) 分子量(SDS-PAGEによる)；約60kD(還元条件下)、約60kD及び約120kD(非還元条件下)

(b) 親和性；陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(c) 熱安定性；70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

(d) アミノ酸配列；内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1～3のアミノ酸配列をもつ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、破骨細胞の分化及び／又は成熟を抑制する活性を示す新規な蛋白質、即ち破骨細胞形成抑制因子(Osteoclast Inhibitory Factor; OCIF)及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きをしている細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される

【0003】

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー（fibroblast growth factor ; FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987）、インシュリン様増殖因子-I (insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J. M. et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988)、インシュリン様増殖因子-II (IGF-II: McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989)、アクチビンA (Activin A ; Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991)、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  ; Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988)、バスキュロトロピン (Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 199, p380, 1994)、及び異所骨形成因子ファミリー (bone morphogenic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682, 1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992, Knutsen R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.194, p1352, 1993) 等のサイトカインが報告されている。

【0004】

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988) やインターロイキン-4 (interleukin-4 ; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993) 等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン (calcitonin ; Bone-Miner., vol.17, p347, 1992)、マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J.Cell. Physiol. vol.137, p19





9, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986) 等が報告されている。

## 【0005】

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD<sub>3</sub>、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イプリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。前述したように、骨代謝は骨形成と骨吸収のバランスによって調節されており、破骨細胞の分化・成熟を抑制するサイトカインは、骨粗鬆症等の骨量減少症の治療薬となることが期待される。従って、本発明は新規な破骨細胞形成抑制因子及びその効率的な製造方法を提供することを課題とする。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、このような現状に鑑み鋭意探索の結果、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90(ATCC寄託-受託番号CCL186)の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性を有する蛋白質OCIFを見出すに至った。

また、細胞培養の担体としてアルミナセラミック片を使用すると本発明の破骨細胞形成抑制因子OCIFを培地中に高濃度に蓄積せしめ、効率よく精製できる

ことを見出した。

さらに、本発明者らは、前記培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、アフィニティーカラム及び逆相カラムで順次処理して吸着及び溶出をくり返すことによって前記蛋白質OCIFを効率よく精製する方法を確立した。

#### 【0008】

次に、得られた天然型蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づき、この蛋白質をコードするcDNAのクローニングに成功した。さらに、このcDNAを用いて遺伝子工学的手法により破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を生産する方法を確立するに至った。

本発明は、ヒト胎児肺線維芽細胞に由来し、還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kD、非還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kD及び約120kDであり、陽イオン交換体及びヘパリンカラムに親和性を有し、70℃、10分間又は56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性が低下し、90℃10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われることを特徴とする蛋白質に関する。本発明の蛋白質OCIFの構造は、既知の破骨細胞形成抑制因子とは明確に相違する。

さらに本発明は、ヒト線維芽細胞を培養し、培養液をヘパリンカラム処理し、吸着画分を溶出し、溶出液を陰イオン交換カラム処理して非吸着画分を得て、この画分を陽イオン交換カラムにかけ吸着・溶出し、さらにヘパリンカラム、アフィニティーカラム、逆相カラムによって精製して前記蛋白質を採取する、蛋白質OCIFの製造方法に関する。本発明におけるカラム処理は、単に培養液等をヘパリンセファロースカラム等に流下させるものばかりではなく、バッチ法で培養液をヘパリンセファロース等と混合し、カラム処理した場合と同等の効果を奏するものも包含する。又、本発明で使用するアフィニティーカラムは、特に好ましくはシバクロンブルーカラムが挙げられる。このシバクロンブルーカラムの充填剤は、親水性合成高分子を担体とし色素シバクロンブルーF3GAを結合させたものであり、このカラムは通常ブルーカラムと呼ばれる。

さらに、本発明は、アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なって効率よく前記蛋白質を製造する方法に関する。

## 【0009】

本発明蛋白質OCIFは、ヒト線維芽細胞の培養液から効率良く且つ高収率で単離精製することができる。この原料からの本発明蛋白質OCIFの製造は、生体物質からの蛋白性物質の分離に汎用される通常の方法を用いて、目的とする蛋白質OCIFの物理的、化学的性質を利用した各種の精製操作に従い実施することができる。この濃縮手段として限外濾過、凍結乾燥、及び塩析等の通常の生化学的処理手段が挙げられる。又、精製手段としては、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、調製用電気泳動等を用いた通常の蛋白性物質の精製に利用される各種の手法を組み合わせる用いることができる。特に好ましくは、原料として用いるヒト線維芽細胞としてヒト胎児肺線維細胞IMR-90(ATCC-CCL186)を用いることが望ましい。そして原料となるヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90の培養は、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90をアルミナセラミック片に付着させ、5%ウシ新生児血清を添加したDMEM培地を培養液として用い、ローラーボトル中で一週間から10日程度静置培養することにより得たものを使用するとよい。又、精製処理を実施する際に界面活性剤として0.1%CHAPS(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate)を添加して精製を行うのが望ましい。

## 【0010】

本発明の蛋白質OCIFは、先ず培養液をヘパリンカラム(ヘパリン-セファロースCL-6B、ファルマシア社)にかけ、2M NaClを含む10mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5で溶出させ、ヘパリン吸着性のOCIF画分を得、この画分をQ・陰イオン交換カラム(HiLoad-Q/FF、ファルマシア社)にかけ、その非吸着画分を集めることにより、ヘパリン吸着性で塩基性のOCIF画分として得ることができる。得られたOCIF活性画分はS・陽イオン交換カラム(HiLoad-S/HP、ファルマシア社)、ヘパリンカラム(ヘパリン-5PW、トーソー社)、シバクロンブルーカラム(ブルー-5PW、トーソー社)、逆相カラム(BU-300C4、パーキンエルマー社)にかけることにより単離・精製することができ、この物質は前述した性質によって特



定される。

【0011】

さらに、本発明は、このようにして得られた天然型蛋白質のアミノ酸配列に基づいてこの蛋白質をコードするcDNAをクローニングし、このcDNAを用いて遺伝子工学的手法で破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質OCIFを得る方法に関する。即ち、本発明の方法に従って精製したOCIF蛋白質をエンドプロテアーゼ（例えばリシルエンドペプチダーゼ）で処理後、生ずるペプチドのアミノ酸配列を決定し、得られた内部アミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドの混合物を作製する。

次に、作製したオリゴヌクレオチド混合物をプライマーとし、PCR法（好ましくはRT-PCR法）を利用してOCIFcDNA断片を取得する。このOCIFcDNA断片をプローブとして、cDNAライブラリーよりOCIFの全長cDNAをクローニングする。得られたOCIFcDNAを発現ベクターに挿入してOCIF発現プラスミドを作製し、これを各種の細胞又は菌株に導入して発現させることにより、組換え型OCIFを製造することができる。

【0012】

OCIF活性は、久米川正好らの方法（蛋白質・核酸・酵素，Vol.34，p999（1989））及びTakahashi N. et al. の方法（Endocrinology，Vol.122，p1373（1988））に従い測定した。即ち、生後約17日のマウス骨髄細胞を標的細胞として用い、活性型ビタミンD<sub>3</sub>（Calcitriol）存在下での破骨細胞の形成抑制を、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導の抑制で試験することにより測定した。

【0013】

本発明の蛋白質である破骨細胞形成抑制因子は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。

医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌



下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤／賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができる。

【0014】

#### 【実施例1】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。しかしこれらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

#### ヒト線維芽細胞IMR-90培養液の調製

ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90(ATCC-CCL186)は、ローラーボトル( $490\text{ cm}^2$ 、 $110\times 171\text{ mm}$ 、コーニング社)中で80gのアルミナセラミック片(アルミナ99.5%、東芝セラミック社)に付着させ培養した。培養には60個のローラーボトルを使用し、ローラーボトル1個当たり5%子牛血清を添加した500mlの10mM HEPES緩衝液添加DMEM培地(ギブコBRL社)を用い、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 存在下で7~10日間静置培養した。培養後培養液を回収し、新たな培地を添加することにより1回の培養で301のIMR-90培養液を得た。得られた培養液を試料1とした。

【0015】

#### 破骨細胞形成抑制活性の測定法

本発明の蛋白性破骨細胞形成抑制因子の活性測定は久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・酵素 Vol.34 p999(1989))及びTakahashi N. et.alの方法(Endocrinology vol.122 p1373 (1988))に従い測定した。即ち、生後約17日のマウスより分離した骨髓細胞を用い、活性型ビタミン $\text{D}_3$ 存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導を指標として試験し、その抑制活性を測定することによって行った。即ち、96ウェルマイクロプレートに $2\times 10^{-8}\text{ M}$ 活性型ビタミン $\text{D}_3$ 及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地(ギブコBRL社)



で希釈したサンプル100  $\mu$ lを入れ、生後約17日のマウスから得た骨髓細胞  $3 \times 10^5$  個を100  $\mu$ lの10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地に懸濁させて播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液160  $\mu$ lを廃棄し、 $1 \times 10^{-8}$ M活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地で希釈したサンプル160  $\mu$ lを添加した。培養7日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン(1:1)溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性測定キット(Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログNo 387-A、シグマ社)を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。

【0016】

#### OCIFの精製

##### i) ヘパリン・セファロースCL-6Bによる精製

約901のIMR-90培養液(試料1)を、0.22  $\mu$ mのフィルター(親水性ミリディスク、2,000 cm<sup>2</sup>、ミリポア社)で濾過した後、3回に分けて0.3M NaClを含む10mM Tris-HCl緩衝液(以下、Tris-HClという)、pH7.5で平衡化させた80mlのヘパリン・セファロースCL-6B(5×4.1cm)にかけた。流速500ml/hrにて、10mM Tris-HCl、pH7.5で洗浄した後、2M NaClを含む10mM Tris-HCl、pH7.5で溶出を行い、ヘパリン・セファロースCL-6B吸着画分900mlを得、得られた画分を試料2とした。

【0017】

##### ii) HiLoad-Q/FFによる精製

ヘパリン・セファロース吸着画分(試料2)を10mM Tris-HCl、pH7.5に対して透析した後、0.1%になるようにCHAPSを加え4℃で一晩放置したものを、2回に分けて0.1% CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で平衡化した陰イオン交換カラム(HiLoad-Q/FF、2.6×10cm、ファルマシア社)にかけ、非吸着画分1000mlを得た。得られた画分を試料3とした。

【0018】

iii) Hi Load-S/HPによる精製

Hi Load-Q非吸着画分(試料3)を、0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で平衡化した陽イオン交換カラム(Hi Load-S/HP、2.6×10 cm、ファルマシア社)にかけた。0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で洗浄した後、100分間でNaClを1Mにする直線勾配、流速8 ml/分にて溶出を行い、12 ml/フラクションにて分取を行った。フラクション1~40を10フラクションづつ4つの画分にまとめ、それぞれ100 μlを用いてOCIF活性を測定した。OCIF活性はフラクション11~30に認められた(図1 図中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30~80%以上抑制される活性を、-は活性が検出されないことをそれぞれ示す)。より比活性の高いフラクション21~30を試料4とした。

【0019】

iv) アフィニティーカラム(ヘパリン-5PW)による精製

120 mlの試料4を240 mlの0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で希釈した後、0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で平衡化したアフィニティーカラム(ヘパリン-5PW、0.8×7.5 cm、トーソー社)にかけた。0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0.5 ml/分にて溶出を行い、0.5 ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション50 μlを用いてOCIF活性を測定し、約0.7~1.3 M NaClで溶出されるOCIF活性画分10 mlを得、試料5とした。

【0020】

v) アフィニティーカラム(ブルー-5PW)による精製

10 mlの試料5を190 mlの0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で希釈した後、0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で平衡化したアフィニティーカラム(ブルー-5PW、

0.5×5.0 cm、トーソー社) にかけた。0.1%CHAPSを含む50 mM Tris-HCl、pH 7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0.5 ml/分にて溶出を行い、0.5 ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション25  $\mu$ lを用いてOCIF活性を測定し、約1.0~1.6M NaClで溶出されるOCIF活性フラクション49~70を得た(図2 図中、+は、OCIF活性を有することを、++は特にOCIF活性が高いことを示す)。

### 【0021】

#### vi) 逆相カラムによる精製

得られたフラクション49~50 mlに、10  $\mu$ lの25%TFA(トリフルオロ酢酸)を加えた後、0.1%TFAを含む25%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム(BU-300、C4、2.1×220 mm、パーキンエルマー社) にかき、60分間でアセトニトリルを55%にする直線勾配、流速0.2 ml/分にて溶出を行い、各ピークを分取した(図3)。各ピークフラクションの100  $\mu$ lを用いてOCIF活性を測定し、ピーク6及びピーク7に濃度依存的に活性を検出した。結果を表1に示す。

### 【0022】

【表1】

逆相カラムから溶出されたOCIF活性

希釈率	1/40	1/120	1/360	1/1080
ピーク6	++	++	+	-
ピーク7	++	+	-	-

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30~80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

### 【0023】

#### OCIFの分子量測定



OCIF活性の認められたピーク6及びピーク7各40 $\mu$ lを用い、還元条件下と非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。即ち、各ピークフラクション20 $\mu$ lづつを2本のチューブに分取し減圧濃縮した後、1mM EDTA、2.5% SDS、及び0.01%プロモフェノールブルーを含む10mM Tris-HCl、pH8.1.5 $\mu$ lで溶解し、それぞれを非還元条件下及び還元条件下（5% 2-メルカプトエタノール存在下）で37℃で一晩放置後、それぞれの1 $\mu$ lをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に負荷した。電気泳動は10-15%アクリルアミドのグラジエントゲル（ファルマシア社）を使用し、電気泳動装置Phast System（ファルマシア社）を用いて行った。分子量マーカーとして、ホスホリラーゼb（94kD）、ウシ血清アルブミン（67kD）、オボアルブミン（43kD）、カルボニックアンヒドラーゼ（30kD）、トリプシンインヒビター（20.1kD）、 $\alpha$ -ラクトアルブミン（14.4kD）を用いた。電気泳動終了後、Phast Gel Silver Stain Kit（ファルマシア社）を用いて銀染色を行った。結果を図4に示す。

## 【0024】

その結果、ピーク6については還元条件下、非還元条件下で約60kDの蛋白質のバンドが検出された。又、ピーク7については、還元条件下で約60kD、非還元条件下で約120kDの蛋白質のバンドが検出された。従って、ピーク7はピーク6の蛋白質のホモダイマーであると考えられる。

## 【0025】

OCIFの熱安定性試験

ブルー5PWフラクション51～52を混合したサンプルから20 $\mu$ lづつを取り、10mM リン酸塩緩衝生理食塩水、pH7.2 30 $\mu$ lを加えた後、70℃及び90℃にて10分間、又は56℃にて30分間熱処理を行った。このサンプルを用い、前述した方法に従いOCIF活性を測定した。結果を表2に示す。

## 【0026】

【表2】

OCIFの熱安定性

希釈率	1/300	1/900	1/2700
未処理	++	+	-
70℃10分	+	-	-
56℃30分	+	-	-
90℃10分	-	-	-

〔表中、++、+、-の意味については表1参照〕

【0027】

(5) 内部アミノ酸配列の決定

ブルー-5PWフラクション51~70について、2フラクションづつを混合して1mlとし、それぞれの試料に10 $\mu$ lの25%TFAを加えた後、1mlずつ10回にわけて0.1%TFAを含む25%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム(BU-300、C4、2.1 $\times$ 220mm、パーキンエルマー社)にかけ、60分間でアセトニトリルを55%にする直線勾配、流速0.2ml/分にて溶出を行い、ピーク6とピーク7を集めた。得られたピーク6とピーク7の一部について、それぞれプロテインシーケンサー(プロサイス、494型、パーキンエルマー社)を用い、N末端アミノ酸配列分析を行ったが、分析不能でありこれらの蛋白質につきN末端はブロックされている可能性が示唆された。そこで、これらの蛋白質の内部アミノ酸配列を解析した。即ち、ピーク6とピーク7のそれぞれを遠心濃縮した後、それぞれに100 $\mu$ gジチオスレイトール、10mMEDTA、7M塩酸グアニジン、及び1%CHAPSを含む0.5M Tris-HCl、pH8.5 50 $\mu$ lを加えて室温で4時間放置し還元した後、0.2 $\mu$ lの4-ビニルピリジンを加え、室温暗所で一晩放置しピリジルエチル化した。これらのサンプルに1 $\mu$ lの25%TFAを加え、0.1%TFAを含む20%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム(BU-300、C4、2.1 $\times$ 3

0 mm、パーキンエルマー社) につけ、30分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.3 ml/分で溶出を行い、還元ピリジルエチル化サンプルを得た。還元ピリジルエチル化したサンプルのそれぞれを遠心濃縮し、8M尿素及び0.1% Tween 80を含む0.1M Tris-HCl、pH 9.2 5  $\mu$ lで溶解した後、73  $\mu$ lの0.1M Tris-HCl、pH 9で希釈し、0.02  $\mu$ gのAP1 (リシルエンドプロテアーゼ、和光純薬社) を加え、37℃で15時間反応させた。反応液に1  $\mu$ lの25% TFAを加え、0.1% TFAで平衡化した逆相カラム (RP-300、C8、2.1  $\times$  220 mm、パーキンエルマー社) につけ、70分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.2 ml/分で溶出を行い、ペプチドフラグメントを得た (図5)。得られたペプチドフラグメント (P1~P3) について、プロテインシーケンサーを用いアミノ酸配列分析を行った。結果を配列表 配列番号1~3に示す。

【0028】

(6) cDNA配列の決定i) IMR-90細胞からのポリ(A)<sup>+</sup> RNAの単離

IMR-90細胞のポリ(A)<sup>+</sup> RNAは、ファストトラックmRNAアイソレーションキット (インヴィトロジェン社) を用い、そのマニュアルに準じて単離した。この方法により $1 \times 10^8$  個のIMR-90細胞より約10  $\mu$ gのポリ(A)<sup>+</sup> RNAを取得した。

【0029】

ii) ミックスプライマーの作製

先に得られたペプチド (配列表 配列番号2及び3) のアミノ酸配列をもとに、次の2種のミックスプライマーを合成した。即ち、ペプチドP2の6番目(Gln) から12番目(Leu) までのアミノ酸配列をコードしうるすべての塩基配列を持つオリゴヌクレオチドの混合物 (ミックスプライマー, No.2F) を合成した。また、ペプチドのP3の6番目(His) から12番目(Lys) までのアミノ酸配列をコードしうるすべての塩基配列に対する相補的オリゴヌクレオチドの混合物 (ミックスプライマー, No.3R) を合成した。ミックスプライマー No.2FおよびNo.3Rの塩基配列を以下に示す。

【0030】

No.2F: 5'-CAAGAACAACCTTTTCAATT-3'

G G G C C GC

A

G

【0031】

No.3R: 5'-TTTATACATTGTAAAAGAATG-3'

C G C G GCTG

A C

G T

【0032】

iii OCIFcDNA断片のPCR による増幅

(6)-i で得たポリ(A)<sup>+</sup> RNA、1  $\mu$ g を鋳型としてスーパースクリプトII cDNA合成キット（ギブコBRL社）を用いて、同社のプロトコールに従って一本鎖cDNAを合成し、このcDNAと(6)-iiで示したプライマーを用いて、PCRを行い、OCIFcDNA断片を取得した。以下に条件を示す。

10X Ex Taqバッファー（宝酒造社）	5	$\mu$ l
2.5 mM dNTP	4	$\mu$ l
cDNA溶液	1	$\mu$ l
Ex Taq（宝酒造社）	0.25	$\mu$ l
蒸留水	29.75	$\mu$ l
40 $\mu$ M プライマーNo.2F	5	$\mu$ l
40 $\mu$ M プライマーNo.3R	5	$\mu$ l

上記の溶液を微量遠心チューブ中で混合後、以下の条件でPCRを行った。95℃で3分前処理後、95℃30秒、50℃30秒、70℃2分の3段階の反応を30回繰り返したのち、70℃5分保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動し約400bpの均一なDNA断片が得られたことを確認した。

【0033】

(7) PCRにより増幅されたOCIFcDNA断片のクローニング及び塩基配列決定

(6)-iii で得られたDNA断片をライゲーションキット（宝酒造社）を用いてブルースクリプトベクター（pBluescript II sk<sup>-</sup>；ストラタジーン社）に挿入し、大腸菌DH5  $\alpha$ （ギブコBRL社）の形質転換を行った。得られた形質転換株を増殖させ、約400bpのOCIF cDNA断片が挿入されたプラスミドを常法に従い精製した。得られたプラスミドに挿入されているOCIF cDNAの塩基配列をタックダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット（Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit；パーキンエルマー社）を用いて決定した。この塩基配列から予測される132個のアミノ酸からなるアミノ酸配列中に、ミックスプライマーを設計するのに用いたOCIFの内部アミノ酸配列（配列表配列番号2及び3）をそれぞれN末側、C末側に見出すことができた。また、OCIFの内部アミノ酸配列（配列表番号1）を、この132個のアミノ酸からなるアミノ酸配列中に見出すことができた。以上の結果より、クローニングした約400bpのcDNAは、OCIF cDNA断片であることが確認された。

【0034】

#### (8) DNAプローブの作製

(7) で作成された約400bpのOCIF cDNA断片が挿入されたプラスミドを鋳型にして(6)-iiiの条件でPCRを行なうことにより、このOCIF cDNA断片を増幅した。アガロース電気泳動により約400bpのOCIF cDNA断片を得た。このDNAをメガプライムDNAラベリングキット（アマシャム社）を用いて [ $\alpha$  <sup>32</sup>P] dCTPで標識し、全長のOCIF cDNAをスクリーニングするためのプローブとして用いた。

【0035】

#### (9) cDNAライブラリーの作成

(6)-i で得られたポリ(A)<sup>+</sup> RNA、2.5  $\mu$ gを鋳型としてグレートレングス cDNA合成キット（クロンテック社）を用いて同社のプロトコールに従い、oligo(dT)primerを用いてcDNAの合成、EcoRI-SalI-Not-Iアダプター付加、cDNAサイズフラクショネーションを行いエタノール沈殿の後10  $\mu$ lのTEバッファに溶解した。得られたアダプター付加cDNA、0.1  $\mu$ gをT4DNAリガーゼを用いてあらかじめEcoRIで切断した1  $\mu$ gの $\lambda$  ZAP エクスプレスベクター（スト

ラタジーン社)に挿入した。このようにして得られた cDNA 組み換えファージ DNA 溶液をギガバックゴールドII (ストラタジーン社)を用いてインヴィトロパッケージング反応に供し、 $\lambda$  ZAP エクスプレス組み換えファージを作成した。

【0036】

(10) 組み換えファージのスクリーニング

(9) で得られた組み換えファージを37℃で15分間大腸菌 XL1-Blue MRF' (ストラタジーン社)に感染させたのち、50℃に加温した0.7%の寒天を含むNZY 培地に添加し、NZY 寒天培地プレートに流しこんだ。37℃で一晩培養後、プラークの生じたプレート上にハイボンドN(アマシャム社)を約30秒密着させた。このフィルターを常法に従いアルカリ変性の後、中和し、2XSSC 溶液に浸したのちUVクロスリンク (ストラタジーン社)によりDNA をフィルターに固定化した。得られたフィルターを100  $\mu$ g/mlのサケ精子DNA を含むハイブリダイゼーションバッファー (アマシャム社)に浸漬し65℃で4 時間前処理した後、熱変性した上記DNA プロープ( $2 \times 10^5$  cpm/ml)を添加した上記バッファーに移し替え65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。反応後フィルターを2XSSC で2 回、0.1XSSC, 0.1%SDS溶液で2 回それぞれ65℃で10分間洗浄した。得られたいくつかの陽性クローンを、さらに2 回スクリーニングを行うことにより純化した。それらの中から約1.6kb のインサートを持つものを以下に用いた。純化したファージを $\lambda$  ZAP エクスプレスクローニングキット (ストラタジーン社)のプロトコールに従い、大腸菌XL1-Blue MRF' に感染させたのち、ヘルパーファージExAssist (ストラタジーン社)で多重感染を行い、その培養上清を大腸菌XL0LR (ストラタジーン社)に感染させたのちカナマイシン耐性株を拾うことによりpBKCMV (ストラタジーン社)に上述の1.6kb のインサートが挿入されたプラスミドをもつ形質転換株を得た。この形質転換株は、FERM P-14998として通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に寄託してある。このプラスミドをもつ形質転換株を増殖させ、常法によりプラスミドを精製した。

【0037】

(11) OCIFの全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列の決定

(10)で得られたOCIF cDNAの塩基配列をタックダイデオキシターミネー



ターサイクルシーケンシングキット（パーキンエルマー社）を用いて決定した。用いたプライマーはT3, T7 プライマー（ストラタジーン社）及びOCIF cDNAの塩基配列に基づいて設計された合成プライマーで、その配列は以下に示す。

T3; 5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3'  
T7; 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'  
IF1; 5'-ACATCAAAACAAAGACCAAG-3'  
IF2; 5'-TCTTGGTCTTTGTTTTGATG-3'  
IF3; 5'-TTATTGCCCACAAACTGAGC-3'  
IF4; 5'-TTGTGAAGCTGTGAAGGAAC-3'  
IF5; 5'-GCTCAGTTTGTGGCGAATAA-3'  
IF6; 5'-GTGGGAGCAGAAGACATTGA-3'  
IF7; 5'-AATGAACAACTTGCTGTGCT-3'  
IF8; 5'-TGACAAATGTCCTCCTGGTA-3'  
IF9; 5'-AGGTAGGTACCAGGAGGACA-3'  
IF10; 5'-GAGCTGCCCTCCTGGATTG-3'  
IF11; 5'-CAAACGTATTTGCTCTGG-3'  
IF12; 5'-GTGTGAGGAGGCATTCTTCA-3'

決定されたOCIFの塩基配列を配列番号5に、その配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0038】

#### (12) OCIF cDNA の発現プラスミドの作製

(10)で得られた約1.6kb のOCIF cDNAが挿入されたプラスミドを制限酵素BamHI およびXhoIで消化し、OCIF cDNAを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX DNA アイソレーションキットを用いて精製した。このOCIF cDNAを、あらかじめ制限酵素BamHI およびXhoIで消化しておいた発現プラスミドpCEP4(インヴィトロジェン社)に、ライゲーションキット（宝酒造社）を用いて挿入し、大腸菌DH5 α（ギブコBRL社）の形質転換を行った。得られた形質転換株を増殖させ、OCIF cDNAが挿入された発現プラスミド

をキアゲンカラム（キアゲン社）を用いて精製した。OCIF発現プラスミドをエタノールによって沈澱させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

【0039】

(13) OCIF cDNAのトランジェントな発現およびその活性の測定

(12)で得られたOCIF発現プラスミドを用いて、以下に述べる方法で組み換えOCIFを発現させ、その活性を測定した。 $8 \times 10^5$  個の293/EBNA細胞（インヴィトロジェン社）を6ウェルプレートの各ウェルに10%牛胎児血清（ギブコBRL社）を含むIMDM培地（ギブコBRL社）を用いて植え込み、翌日、培地を除いた後、無血清IMDM培地で細胞を洗った。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン（ギブコBRL社）添付のプロトコールに従い、あらかじめOPTI-MEM培地（ギブコBRL社）を用いて希釈しておいたOCIF発現プラスミドとリポフェクタミンを混合した後、この混合液を各ウェルの細胞に加えた。用いた発現プラスミドおよびリポフェクタミンの量はそれぞれ3  $\mu$ g および12  $\mu$ l であった。38時間後、培地を除き1mlの新しいOPTI-MEM培地を加え、さらに30時間後、培地を回収し、これをOCIF活性測定用サンプルとした。OCIFの活性測定は以下のようにして行った。生後約17日のマウス骨髄細胞からの活性型ビタミンD<sub>3</sub>存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定し、OCIFの活性とした。すなわち、96ウェルマイクロプレートに $2 \times 10^{-8}$ M活性型ビタミンD<sub>3</sub> 及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地（ギブコBRL社）で希釈したサンプル100  $\mu$ l を入れ、生後約17日のマウス骨髄細胞 $3 \times 10^5$  個を100  $\mu$ lの10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地に懸濁させて播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液160  $\mu$ lを廃棄し、 $1 \times 10^{-8}$ M活性型ビタミンD<sub>3</sub> 及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地で希釈したサンプル160  $\mu$ lを添加した。培養7日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール／アセトン（1：1）溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性測定キット（Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログNo 387-A、シグマ社）を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。その結





果、表3に示すように、先にIMR-90の培養液から得られた天然型OCIFと同様の活性を有することが確認された。

【0040】

【表3】

293/EBNA細胞で発現させた培養液中のOCIF活性

希釈率	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
OCIF							
遺伝子導入	++	++	++	++	++	+	-
ベクター導入	-	-	-	-	-	-	-
未処理	-	-	-	-	-	-	-

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

【0041】

【発明の効果】

本発明により、新規な破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質及びその効率的な製造方法が提供される。本発明の蛋白質は破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤として或いはこれらの疾患の免疫学的診断のための抗原等として有用である。



【0042】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド（蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Tyr His Phe Pro Lys

1 5

【0043】

配列番号：2

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド（蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Gln His Ser Xaa Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Xaa Lys

1 5 10

【0044】

配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド（蛋白質の内部アミノ酸）

配列：



Xaa Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys

1 5 10

【0045】

配列番号：4

配列の長さ：401

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

1 5 10 15

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

20 25 30

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

35 40 45

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

50 55 60

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

65 70 75

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

80 85 90

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

95 100 105

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

110 115 120

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr

125 130 135

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe



140	145	150
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
155	160	165
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
170	175	180
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
185	190	195
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
200	205	210
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
215	220	225
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
230	235	240
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
245	250	255
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
260	265	270
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
275	280	285
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
290	295	300
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
305	310	315
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
320	325	330
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
335	340	345
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
350	355	360



Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe

365 370 375

Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly

380 385 390

Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

395 400

【0046】

配列番号：5

配列の長さ：1206

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

ATGAACAACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60  
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120  
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180  
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240  
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300  
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360  
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420  
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTCTTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480  
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540  
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600  
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660  
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720  
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780  
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840



GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900  
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960  
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020  
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080  
GTCATCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140  
TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200  
TTATAA 1206



【図面の簡単な説明】

【図1】

Hi Load-Q/FF非吸着画分粗精製製品（試料3）をHi Load-S/HPカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図2】

ヘパリン-5PW粗精製製品（試料5）をブルー-5PWカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図3】

ブルー-5PW溶出フラクション49～50を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図4】

最終精製製品の還元条件下と非還元条件下におけるSDS-PAGEの結果を示す。

【符号の説明】

レーン1、4；分子量マーカー

レーン2、5；ピーク6

レーン3、6；ピーク7

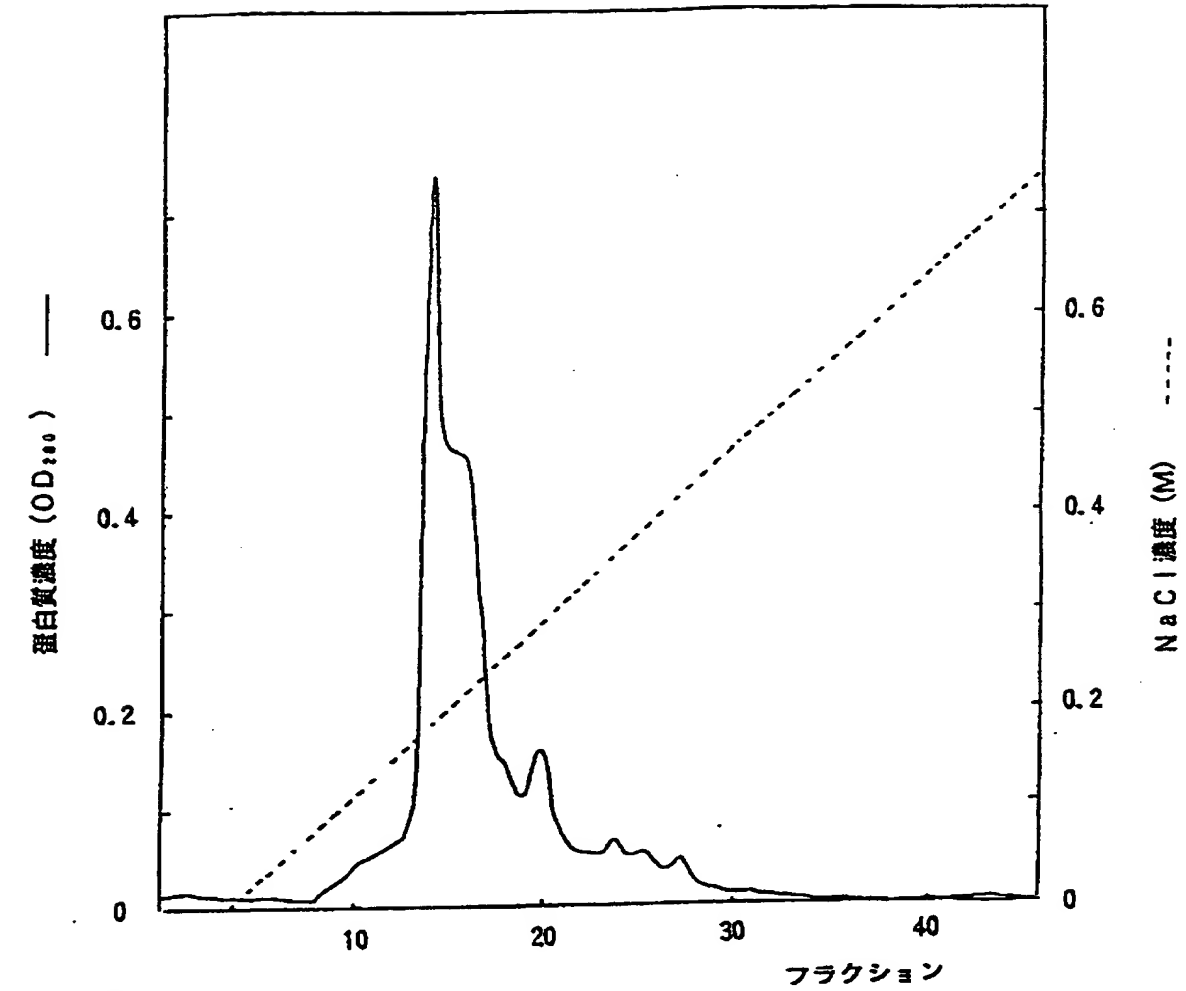
【図5】

還元ピリジリエチル化後、リシルエンドプロテアーゼ処理したピーク7を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【書類名】

図面

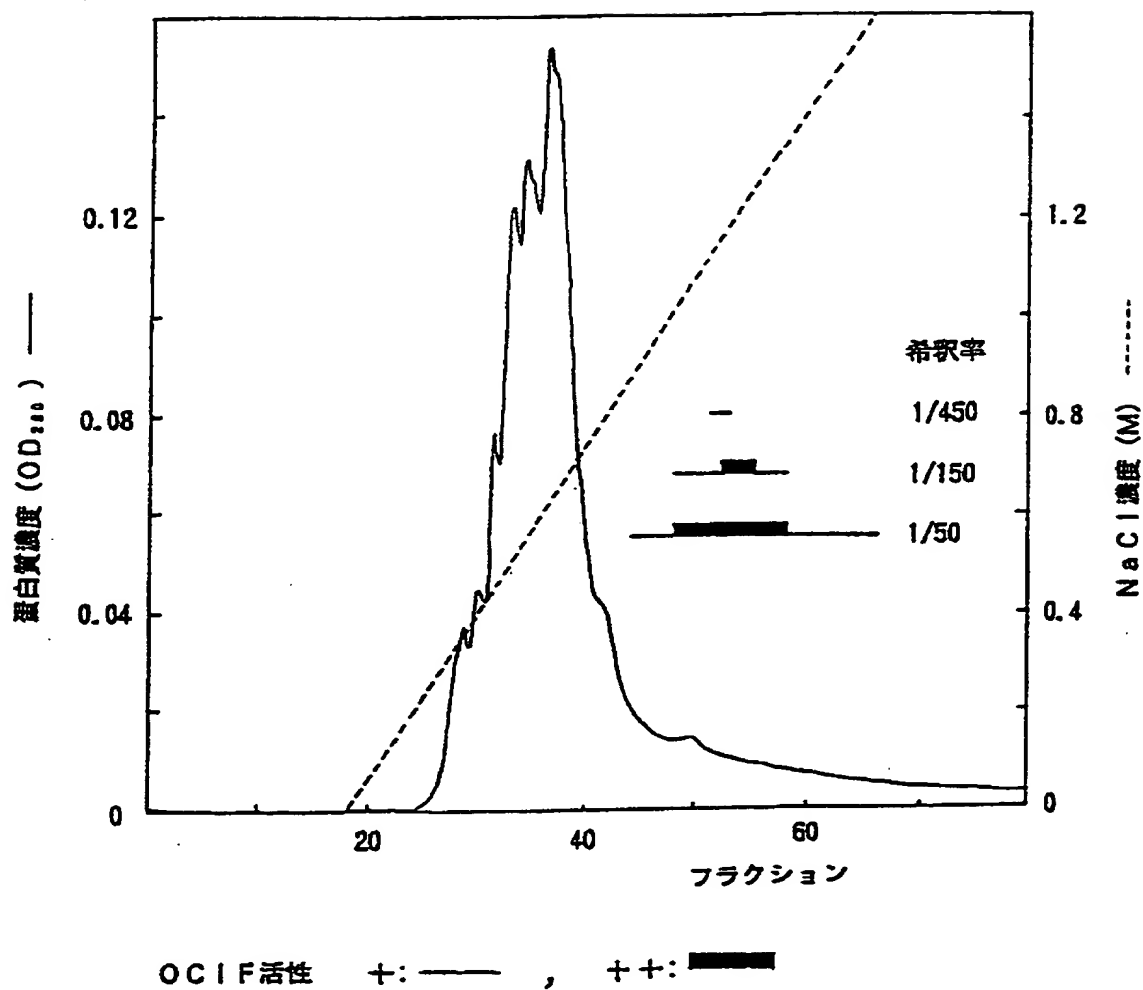
【図1】



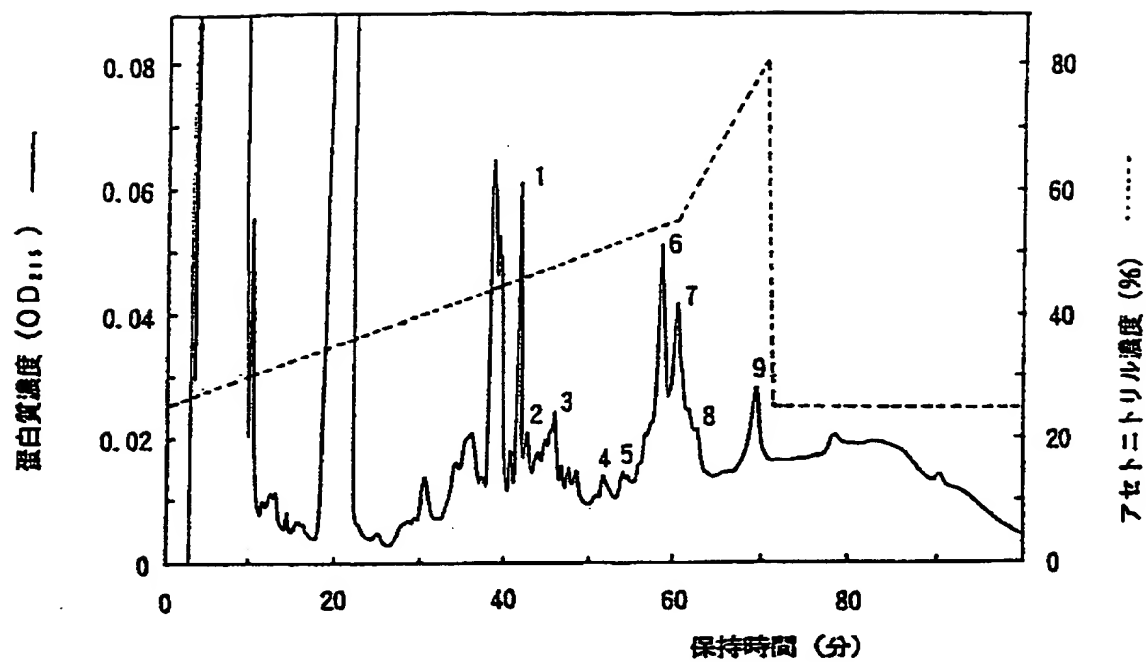
OCIF活性	希釈率				
	1/100	—	++	++	—
	1/500	—	++	++	—



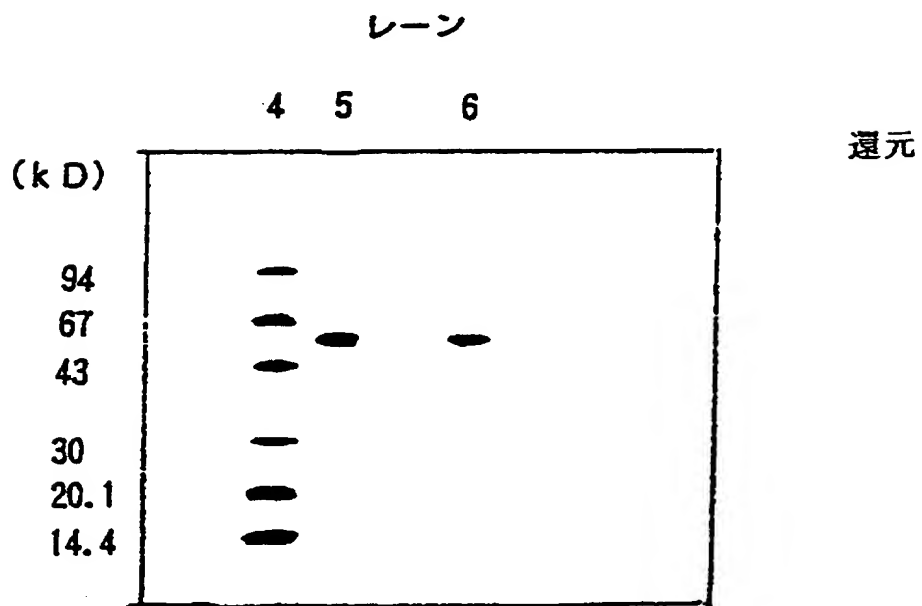
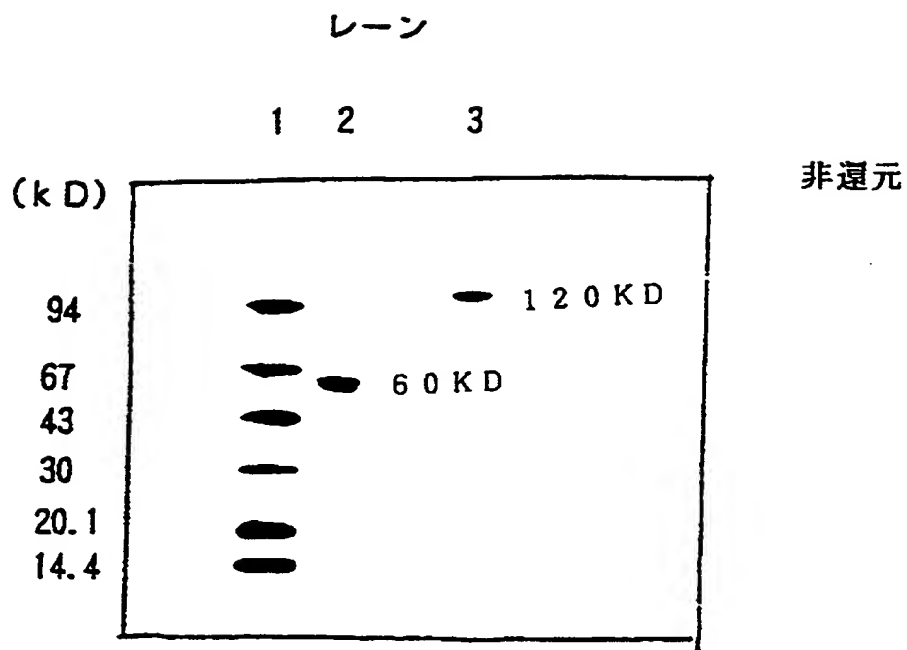
【図2】



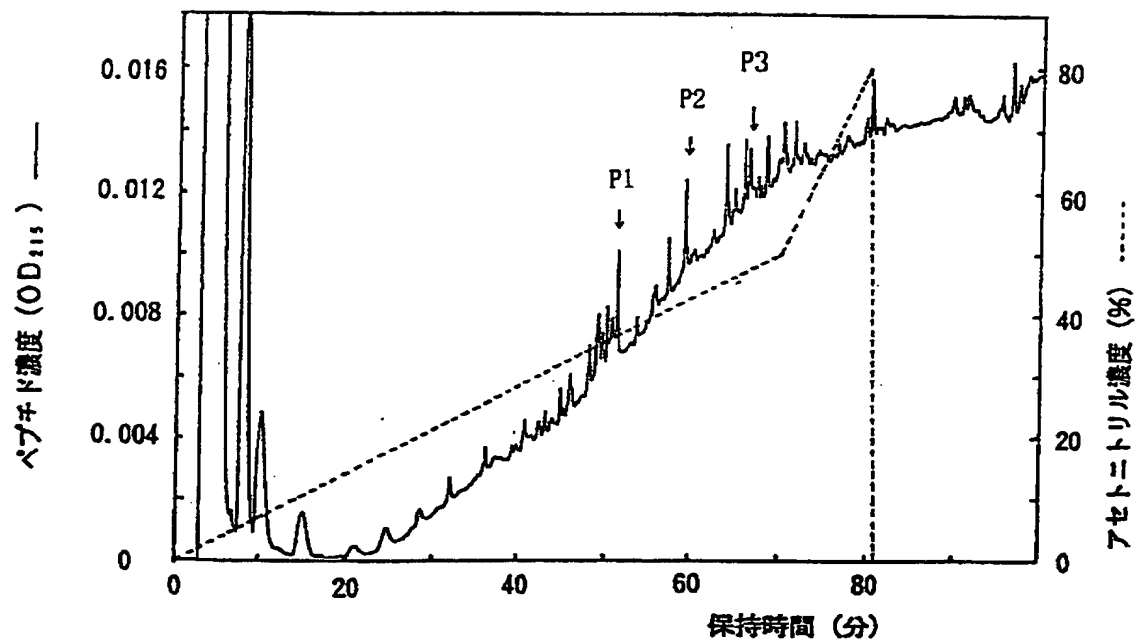
【図3】



【図4】



【図5】





【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 次の物理化学的性質をもつ破骨細胞の分化・成熟抑制活性のある蛋白質。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60 kD (還元条件下)、約60 kD及び約120 kD (非還元条件下)

(b) 親和性 ; 陽イオン交換体及びヘパリンに対して親和性を示す。

(c) 熱安定性 ; 70℃、10分間または56℃、30分間の熱処理により活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により活性が失われる。

(d) アミノ酸配列 ; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1～3のアミノ酸配列をもつ。

ヒト線維芽細胞の培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、アフィニティーカラム及び逆相カラムで処理して吸着及び溶出をくり返して精製を行なう破骨細胞形成抑制蛋白質の製造法。この蛋白質は遺伝子工学的手法によっても生産される。

【効果】 骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤あるいは生化学的試薬として有用である。

【選択図】 なし



特平 7-207508



省式 7

受 託 証

通 知 番 号 : 7 生寄文 第 978 号

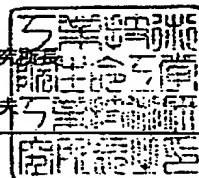
通 知 年 月 日 : 平成 7 年 6 月 21 日

雪印乳業株式会社 生物科学研究所  
所長 竹下 保義

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大石 道夫



I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示)  DBK/01F10	(受託番号)  FERM P- 14998
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。  <input type="checkbox"/> 科学的性質  <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
当所は、平成 7 年 6 月 21 日に受領した I 欄の微生物を受託する。	



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000006699  
【住所又は居所】 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号  
【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100090941  
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階  
藤野・児玉特許事務所  
【氏名又は名称】 藤野 清也  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100105061  
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階  
藤野・児玉特許事務所  
【氏名又は名称】 児玉 喜博  
【提出された物件の記事】  
【提出物件名】 受託証 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

氏 名 雪印乳業株式会社